沉迷游戏青年的尿液蛋白质组学分析

杨民辉，刘禹卿，沈梓芸，王海彤，高友鹤*

北京师范大学 生命科学学院 基因工程药物及生物技术北京市重点实验室

北京 100875

摘要：

电子游戏成瘾表现为对数字游戏的不断增长的热情和无节制的使用，但游戏成瘾无客观指标。本研究利用质谱蛋白质组学技术分析了沉迷游戏的青少年与不玩电子游戏的青少年尿液中的蛋白质组差异。共纳入 10 名沉迷游戏的青少年和 9 名不玩电子游戏的青少年作为对照组。结果显示，两组之间存在 125 种差异显著的蛋白质，其中有 11 个蛋白已被报道服用精神类药物后在体内发生变化，并与成瘾相关：Calmodulin、ATP synthase subunit alpha、ATP synthase subunit beta、Acid ceramidase、Tomoregulin-2、Calcitonin、Apolipoprotein E、Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase、Heat shock protein beta-1、CD63 antigen、Ephrin type-B receptor 4、Tomoregulin-2。另外有多个蛋白可以与成瘾相关的通路相互作用：Dickkopf-related protein 3、Nicastrin、Leucine-rich repeat neuronal protein 4 、Cerebellin-4。在富集到的生物学通路中发现一氧化氮合酶的相关通路、安非他命成瘾相关通路和许多钙离子通路等一些和成瘾相关的通路。同时，通过对差异表达蛋白的分析，我们推测了一些尚未被充分研究的蛋白质，这些蛋白质可能在成瘾机制中扮演着重要角色：Protein kinase C and casein kinase substrate in neurons protein、、Cysteine-rich motor neuron 1 protein、Bone morphogenetic protein receptor type-2、Immunoglobulin superfamily member 8。 在对网络游戏成瘾青少年的尿液蛋白质进行分析时，我们发现了多种先前已在药物成瘾研究中被报道的蛋白质。

关键词：尿液，蛋白质组学，成瘾，电子游戏

Proteomic Analysis of Urine from Youths Indulging in Gaming

Minhui Yang[1] Yuqing Liu[2] Ziyun Shen[3] Haitong Wang[3] Youhe Gao[1]*

[1](Gene Engineering Drug and Biotechnology Beijing Key Laboratory, College of Life Sciences，Beijing Normal University, Beijing 100871, China)

Abstract:

Video game addiction manifests as an escalating enthusiasm and uncontrolled use of digital games, yet there are no objective indicators for gaming addiction. This study employed mass spectrometry proteomics to analyze the proteomic differences in the urine of adolescents addicted to gaming compared to those who do not play video games. The study included 10 adolescents addicted to gaming and 9 non-gaming adolescents as a control group. The results showed that there were 125 significantly different proteins between the two groups. Among these, 11 proteins have been reported to change in the body after the intake of psychotropic drugs and are associated with addiction: Calmodulin, ATP synthase subunit alpha, ATP synthase subunit beta, Acid ceramidase, Tomoregulin-2, Calcitonin, Apolipoprotein E, Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, Heat shock protein beta-1, CD63 antigen, Ephrin type-B receptor 4, Tomoregulin-2. Additionally, several proteins were found to interact with pathways related to addiction: Dickkopf-related protein 3,

---

基金项目：北京师范大学（11100704）

通信联系人：高友鹤（1964.06—），男，教授，博士生导师，主要研究方向：尿液蛋白质组学与尿液生物标志物.E-mail: gaoyouhe@bnu.edu.cn.

Nicastrin, Leucine-rich repeat neuronal protein 4, Cerebellin-4. Enriched biological pathways discovered include those related to nitric oxide synthase, amphetamine addiction, and numerous calcium ion pathways, all of which are associated with addiction. Moreover, through the analysis of differentially expressed proteins, we speculated about some proteins not yet fully studied, which might play a significant role in the mechanisms of addiction: Protein kinase C and casein kinase substrate in neurons protein, Cysteine-rich motor neuron 1 protein, Bone morphogenetic protein receptor type-2, Immunoglobulin superfamily member 8. In the analysis of urinary proteins in adolescents addicted to online gaming, we identified several proteins that have previously been reported in studies of drug addiction.
Keywords：urine; proteomics; addiction; video games

1. 前言

电子游戏成瘾，作为一种现代社会日益关注的问题，已经引起了全球范围内专家学者的广泛研究。近年来，随着互联网技术的迅猛发展和电子游戏行业的蓬勃兴起，越来越多的人，尤其是青少年，沉迷于电子游戏，从而导致了一系列的心理、社会和生理问题[1]。

在精神病学领域，游戏成瘾被视为一种冲动控制障碍，表现为对游戏的强烈渴望、无法控制的游戏行为、对其他活动的兴趣丧失以及持续游戏带来的负面后果[2]。这些特点不仅对个人健康造成严重影响，还可能破坏社交关系和生活质量。根据一项全球范围的研究，电子游戏成瘾与多种心理健康问题相关，包括抑郁、焦虑和社会功能障碍[3]。此外，神经影像学研究发现，与物质依赖相似，电子游戏成瘾也会导致大脑结构和功能的变化[4, 5]。电子游戏成瘾的形成可能与多种因素有关，包括个人心理特质、社会环境和游戏设计元素[1]。研究表明，游戏中的奖励系统、社交互动和沉浸式体验是促进成瘾行为的关键因素[6]。

考虑到电子游戏成瘾的严重性和普遍性，理解其成瘾机制和影响对于制定有效的预防和干预策略至关重要。未来的研究应继续探索游戏成瘾的神经生物学基础，以及如何通过心理和社会干预措施有效应对这一挑战。

尿液蛋白质组学在生物标志物的发现和分析中展现了显著的潜力。与其他生物样本相比，尿液具有独特的优势：它不受生理稳态机制的严格调节，因此能更灵敏地反映出体内微小的生物化学变化[7]。此外，尿液的采集过程无创、简便，这使得它成为理想的生物标志物来源。目前，已有众多研究证实尿液中的蛋白质可以作为多种脑部神经疾病的生物标志物，如帕金森综合征[8]、阿尔兹海默症[9]、抑郁症[10]和自闭症[11]等。然而，在尿液蛋白质组学领域，还没有针对游戏成瘾的研究。本文不仅拓宽了我们对电子游戏成瘾机制的理解，还有望帮助开发针对此类疾病的新型疗法。因此我们对沉迷游戏青年的尿液蛋白质组学研究，技术路线如图一所示。

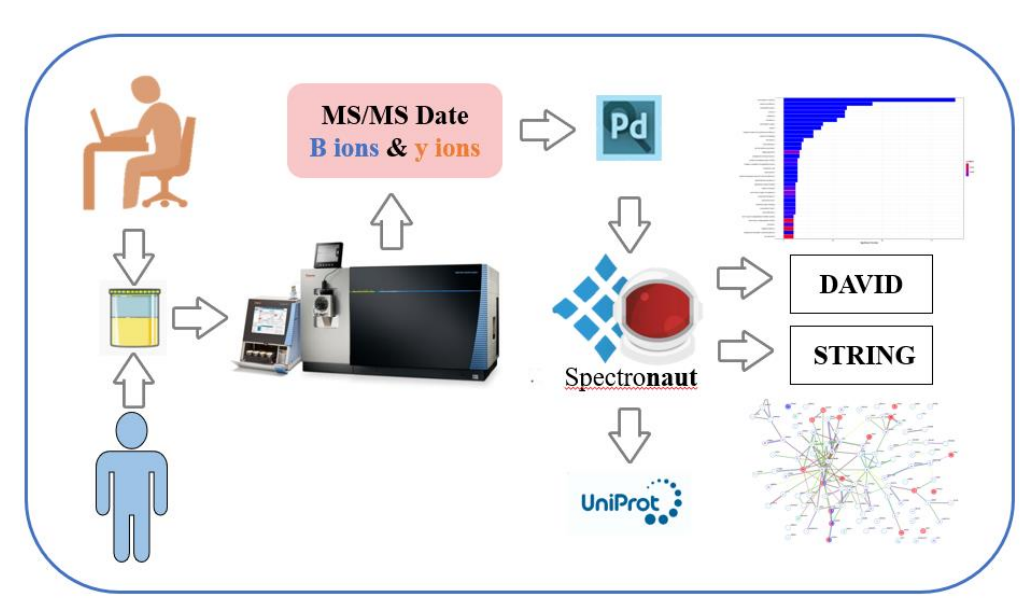


图 1 沉迷游戏青年的尿液蛋白质组学分析技术路线

2. 材料与方法

2.1 样本收集

本研究共收集 10 位沉迷游戏青年（平均年龄 22 岁）的尿液和 9 位基本不玩游戏青年男性（平均年龄 24 岁）的尿液，采样地点在网吧、被试家中。采样标准是符合 Young 氏网络成瘾诊断标准中度网瘾，被试均出现不玩游戏会有心里不适的状况，每日游戏时长 6-9 小时。志愿者均签署知情书本实验已向志愿者提供研究的详细情况，内容包括研究目的、方法及过程，同时对志愿者的个人资料严格保密。对志愿者的饮食、药物和其他因素没有任何限制或要求，收集到尿液储存在-80°c。样本信息详见表 1。

表 1 被试信息

被试编号	性别	年龄	每日游戏时长
case 1	男	18	7-9h
case 2	男	20	8-9h
case 3	男	19	6-8h
case 4	男	22	8-9h
case 5	男	18	6-8h
case 6	男	22	8-9h
case 7	男	24	7-9h
case 8	男	19	6-8h
case 9	男	26	8-9h
case 10	男	20	6-8h
control 1	男	27	0h
control 2	男	24	0.5-1h
control 3	男	24	0.5-1h
control 4	男	20	0.5-1h
control 5	男	23	0.5-1h

control 6	男	27	0h
control 7	男	25	0.5-1h
control 8	男	28	0h
control 9	男	26	1h

2.2 尿液样品的处理

首先将尿液样本以 12000g 在 4℃下离心 30min.。然后，取 6 毫升尿液，用五倍体积的乙醇在-20℃下沉淀每份样本中的 15mL 尿液过夜。12000g 离心后得到蛋白质沉淀，将其溶于裂解缓冲液(8 mol/L 尿素、2 mol/L 硫脲、50 mmol/L Tris 和 25 mmol/L 二硫苏糖醇)中。然后使用 Bradford 分析法对上清液进行定量分析。

使用过胰蛋白酶消化总计 100μg 蛋白质。将每个样本中的蛋白装入一个 10-kDa 的过滤设备中。用尿素缓冲液和 25 mmol/LNH4HCO3 溶液洗涤两次后，在 37℃下用 20 mmol/L 二硫苏糖醇还原 1h，并在避光环境用 50mmol/L 碘乙酰胺(IAA)烷基化 45mina 然后用 UA 和 NH4HCO3 洗涤样本，并用胰蛋白酶（酶与蛋白的比例为 1：50)在 37℃下消化过夜 14~16h。使用 Oasis HLB 试剂盒对消化的肽进行脱盐，然后通过冻干机进行干燥。将消化后的肽类物质在 0.1%的甲酸中溶解，随后稀释至 0.5μg/μL 的浓度。

2.3 LC-MS/MS 串联质谱分析

分离得到的蛋白质样品经过离子化处理进入质谱仪。每个样品按 1 μg 多肽质量进行分析：Thermo EASY-nLC1200 色谱系统加载至预柱与分析柱上。通过 Thermo Orbitrap Fusion Lumos 质谱系统(Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany) 采集蛋白质组数据。

2.4 数据处理和分析

每个多肽样品在 DIA 模式下进行质谱数据采集。质谱数据的处理和分析则借助 Spectronaut X 软件完成。对每个样本的 DIA 采集的原始文件（raw 文件）进行数据库搜索。

我们应用谱图数定量法来进行差异蛋白的筛选。筛选条件：Fold change≥1.5 或≤0.67，配对 t 检验分析的 P 值校正值＜0.05。后续通过 DAVID Functional Annotation Bioinformatics Microarray Analysis 分析以及 Pubmed 数据库已报道文献检索等对差异蛋白进行功能分析。

3. 结果与讨论

3.1 尿液蛋白质组分析

尿液样本处理好后，对 19 个蛋白样本进行 LC-MS/MS 串联质谱分析。总共鉴定到 1205 个蛋白（特异性多肽≥2 个，蛋白水平 FDR<1%）。

将 10 例沉迷游戏青年和 9 例健康样本成组比较，共鉴定到 125 个差异蛋白，随机分组产生的差异蛋白为 36 个，如表一所示。差异蛋白筛选条件为 FC≥1.5 或≤0.67，P < 0.05，差异蛋白的具体信息列在表 2 中。通过将分组打乱进行随机匹配得到平均差异蛋白为 36 个，证明差异蛋白结果可信，非随机产生，如表 1。

表 2 随机分组

Fitter Criteria	Number of differential proteins	Grouping possibility	Average numbers of proteins withfalse random combinations	Reliability
FC>1.5 或 <0.67-P<0.05	125	46189	36	71.2%

表 3 差异蛋白

Protein name	FC	P
Elongation factor Tu 1 (EF-Tu 1)	3.70	3.39E-02
Outer membrane protein Omp38	3.22	3.69E-03
ATP synthase subunit alpha, mitochondrial	3.03	2.97E-02
Acid ceramidase	2.51	6.21E-03
Proline-rich transmembrane protein 4	2.50	8.57E-03
Golgi integral membrane protein 4	2.34	4.90E-03
Myc box-dependent-interacting protein 1	2.23	2.34E-02
Na(+)/H(+) exchange regulatory cofactor NHE-RF1	2.11	4.09E-02
Charged multivesicular body protein 2a	2.06	2.06E-02
Myelin protein zero-like protein 2	2.03	3.09E-02
Copine-3 (Copine III)	2.03	3.28E-02
UDP-GalNAc:beta-1,3-N-acetylgalactosaminyltransferase 1	1.96	2.93E-02
Attractin (DPPT-L)	1.95	1.92E-02
Endonuclease domain-containing 1 protein	1.88	2.53E-02
Trypsin	1.77	4.27E-02
Calcitonin	1.73	2.83E-02
Immunoglobulin heavy variable 3-7	1.70	4.07E-02
Polymeric immunoglobulin receptor	0.64	1.07E-02
Immunoglobulin heavy constant gamma 2	0.64	3.73E-02
Immunoglobulin heavy constant mu	0.61	4.30E-02
Apolipoprotein E (Apo-E)	0.61	1.02E-02
Glycophorin-A	0.59	3.41E-02
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	0.59	2.73E-02
Heat shock protein beta-1	0.57	2.32E-02
Complement factor I	0.57	1.67E-02
Myeloperoxidase	0.57	2.98E-02
Thyroxine-binding globulin	0.56	4.05E-02
ATP synthase subunit beta, mitochondrial	0.56	3.77E-02
Apolipoprotein A-IV	0.55	2.82E-02
Annexin A6	0.55	2.85E-02
Corticosteroid-binding globulin)	0.55	1.28E-02
Heat shock protein HSP 90-beta	0.54	3.52E-02
CD63 antigen	0.54	3.37E-02
Annexin A4	0.54	2.64E-02

Histone H2A type 1	0.54	1.24E-02
Calmodulin-1	0.54	3.48E-02
Histone H1.4	0.54	4.84E-02
Fibroblast growth factor receptor 1	0.53	2.66E-02
Coagulation factor V	0.52	9.97E-03
Xaa-Pro dipeptidase	0.52	4.36E-02
Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1	0.50	3.53E-03
Plastin-3 (T-plastin)	0.50	2.51E-02
Glucosidase 2 subunit beta	0.50	3.37E-02
Pyruvate kinase PKM	0.49	1.81E-02
15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase [NAD(+)] (15-PGDH)	0.49	4.05E-02
N-acetylglucosamine-6-sulfatase	0.49	1.87E-02
Peptidyl-glycine alpha-amidating monooxygenase (PAM)	0.49	3.55E-02
Parvalbumin alpha	0.49	1.34E-02
Iduronate 2-sulfatase	0.49	3.21E-02
Vitamin K-dependent protein Z	0.48	2.10E-02
Receptor-type tyrosine-protein phosphatase gamma	0.47	3.10E-02
Receptor-type tyrosine-protein phosphatase zeta	0.47	2.60E-02
Cofilin-1	0.47	2.13E-02
Collagen alpha-3(V) chain	0.46	8.20E-03
Kallistatin	0.46	1.16E-02
Aquaporin-1	0.46	3.47E-02
Phosphatidylethanolamine-binding protein 1	0.46	4.67E-02
Profilin-2 (Profilin II)	0.46	9.81E-03
Alpha-L-iduronidase	0.45	4.08E-02
Hippocalcin-like protein 1	0.45	3.41E-02
Biotinidase	0.45	3.66E-02
Ras GTPase-activating-like protein IQGAP1	0.44	2.17E-02
Lithostathine-1-beta	0.44	4.44E-02
MARCKS-related protein	0.44	1.34E-02
Hsc70-interacting protein	0.44	4.53E-02
Palmitoyl-protein thioesterase 1	0.43	4.04E-02
Annexin A11	0.43	3.66E-02
Ras-related protein Rab-5C	0.42	5.80E-03
Stanniocalcin-1 (STC-1)	0.42	1.86E-02
UV excision repair protein RAD23 homolog B	0.42	4.60E-02
Ephrin type-B receptor 4	0.42	2.02E-02
Alpha-N-acetylglucosaminidase	0.41	1.43E-02
Galactocerebrosidase	0.41	3.91E-02
Triosephosphate isomerase	0.41	1.95E-02
Destrin	0.41	3.28E-02
Ras-related protein Rab-2A	0.41	3.79E-02
Ubiquitin-conjugating enzyme E2 L3	0.41	3.72E-02
Brain acid soluble protein 1	0.41	1.89E-03

Nucleobindin-1 (CALNUC)	0.41	1.59E-02
Complement component 1 Q subcomponent-binding protein, mitochondrial	0.40	1.69E-02
Desmocollin-1	0.40	3.02E-02
Contactin-1	0.39	2.68E-02
Bone morphogenetic protein receptor type-2	0.39	1.28E-02
Dystroglycan 1	0.39	4.07E-02
Fibroleukin	0.38	1.34E-02
Growth arrest-specific protein 6	0.37	2.73E-02
Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H4	0.37	4.48E-02
Na(+)/H(+) exchange regulatory cofactor NHE-RF2	0.37	4.04E-02
Laminin subunit alpha-4	0.36	7.73E-03
C3a anaphylatoxin chemotactic receptor	0.36	4.84E-02
Ephrin type-A receptor 10	0.35	1.71E-02
Na(+)/H(+) exchange regulatory cofactor NHE-RF3	0.35	1.91E-02
ER membrane protein complex subunit 10	0.35	4.16E-02
BRO1 domain-containing protein BROX	0.34	1.96E-02
Seizure 6-like protein 2	0.34	2.50E-02
ADAMTS-like protein 4 (ADAMTSL-4)	0.34	2.00E-02
L-xylulose reductase	0.33	2.20E-02
Armadillo-like helical domain-containing protein 4	0.33	2.26E-02
Golgi membrane protein 1	0.33	2.41E-02
Cell adhesion molecule 4	0.33	9.99E-03
CD99 antigen-like protein 2	0.33	3.65E-02
Leucine-rich repeat neuronal protein 4	0.32	3.00E-02
MIT domain-containing protein 1	0.32	7.83E-03
High affinity immunoglobulin alpha and immunoglobulin mu Fc receptor	0.32	2.01E-02
Nicastrin	0.31	3.18E-02
Protein NDRG1 (Differentiation-related gene 1 protein)	0.30	1.13E-02
Golgi apparatus protein 1	0.30	3.76E-03
Immunoglobulin superfamily member 8	0.30	1.21E-02
Cyclic AMP-dependent transcription factor ATF-6 beta	0.29	1.53E-03
Endoplasmic reticulum resident protein 44	0.28	1.43E-02
EH domain-containing protein 1	0.28	2.45E-03
Anthrax toxin receptor 1	0.28	4.57E-02
Podocin	0.27	2.79E-03
Interleukin-1 receptor accessory protein	0.26	4.03E-02
Matrix-remodeling-associated protein 5	0.26	2.33E-02
Heme-binding protein 1 (p22HBP)	0.26	4.70E-02
Cerebellin-4	0.24	1.42E-02
Glycoprotein integral membrane protein 1	0.23	3.95E-02
Cysteine-rich motor neuron 1 protein	0.23	1.16E-02
Charged multivesicular body protein 5	0.21	4.12E-02
Dickkopf-related protein 3	0.20	4.61E-02

Prenylcysteine oxidase 1	0.20	4.88E-02
Tomoregulin-2	0.13	2.67E-02
Protein kinase C and casein kinase substrate in neurons protein 3	0.13	2.14E-02
Angiopoietin-related protein 2	0.09	4.87E-02

在符合要求的差异蛋白中(FC≥1.5 或≤0.67，P < 0.05)进行 PubMed 检索，共发现 11 个蛋白已被报道和成瘾相关 ATP synthase subunit alpha、ATP synthase subunit beta 、Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase、Acid ceramidase、Calcitonin、Apolipoprotein E、Calmodulin-1、Ephrin type-B receptor 4 、Heat shock protein beta-1、CD63 antigen、Tomoregulin-2。

在研究中发现了一系列差异性蛋白,这些蛋白在不同药物成瘾的情况下表现出独特的变化。以 ATP synthase subunit alpha 为例，这一蛋白质作为 F 型 ATP 合酶的关键组成部分[12]，在长期吗啡治疗后，其在大鼠纹状体中的表达水平有所下降[13]。ATP synthase subunit beta 在可卡因过量人群的伏隔核中表达也降低[14, 15]。在吗啡暴露 10 天、停药 20 天后的观察中，另一关键蛋白—Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase 也显示出显著的表达变化[16]。Wenchao Li 及其同事利用高通量链特异性 RNA 测序，研究了可卡因如何影响小鼠脑岛中的基因表达。他们的 GO 富集分析揭示了可卡因对突触传递神经酰胺酶活性的调节作用[17]，而在本实验组中差异蛋白 Acid ceramidase 是对照组的 2.5 倍。另外有研究表明可卡因戒断后血清中的降钙素(Calcitonin)水平显著上升[18]。

对于甲基苯丙胺成瘾的研究揭示出，在急性暴露于该药物时，脑实质中 Apolipoprotein E (ApoE)蛋白的表达水平会上升。这种上升激活了脑毛细血管上的 ApoE 受体-2，并影响了 LTP 的表达[19]。MICHELHAUGH S K 的研究进一步指出，甲基苯丙胺能显著增加大鼠脑部区域中 calmodulin 的含量和信使 RNA 水平[18, 19]。在甲基苯丙胺戒断者（WMA）与健康对照组（HC）之间的比较研究发现，Ephrin type-B receptor 2 (EPHB2)的表达存在显著差异[20]。这一发现提示 EPHB2 可能在调控谷氨酸代谢途径中发挥作用。甲基苯丙胺戒断对脑应激系统和心脏交感神经通路激活的影响中发现：甲基苯丙胺戒断增加了心脏中 Heat shock protein beta-1 的水平[21]。此外，与健康对照组相比，海洛因、可卡因和大麻成瘾者的血小板中 CD63 antigen 的表达显著降低[22]。

Tomoregulin-2 可以促进 ERK1/2 磷酸化，而细胞外信号调节激酶 （ERK） 已被证明被阿片类药物激活，并在功能上与成瘾有关[23]。其同一家族的 Tomoregulin-1 和 addicsin （该蛋白在吗啡给药小鼠的杏仁核中高度上调）形成复合物，影响 Tomoregulin-1 在细胞内的分布并调节细胞迁移，并且证明了 Tomoregulin-1 是一种新的 addicsin 相关因子[24] 。Tomoregulin-1 和 Tomoregulin-2 都是属于 TMEFF 家族的蛋白质，而 Tomoregulin-2 已经被证明在除垂体以外的所有大脑区域高度表达，在杏仁核和胼胝体中表达。是海马神经元和中脑神经元的存活因素[23]，且存在于阿尔茨海默病斑块中[25]。

值得一提的是 Tomoregulin-2 在神经模式形成过程中可能抑制 Bone Morphogenetic Proteins (BMP)信号传导[26]，BMP 在中枢神经系统中扮演着至关重要的角色，特别是在神经可塑性方面。它们在中枢神经系统发育的多个阶段中发挥作用，包括大脑和脊髓的形成与模式化。在成年人的大脑中，BMP 在与神经可塑性相关的区域中被检测到，且已被证实能够调控神经发生、神经胶质细胞的形成，以及突触和树突的可塑性[27, 28]。这些发现表明，BMP 对于大脑结构和功能的动态调整至关重要，能够适应新的经验和学习过程。同时我们在差异蛋白中发现 Cysteine-rich motor neuron 1 protein、Bone morphogenetic protein receptor type-2 分别调节海马细胞和神经中枢的 BMP 信号传导，我们推测这两个蛋白可能在成瘾机制中发挥作用。

有趣的是的是我们在差异蛋白中同时发现 ATP 合酶亚基 α 和 ATP 合酶亚基 β。ATP 合酶是一种关键的细胞内酶，其主要功能是催化三磷酸腺苷（ATP）的合成。这一复杂的酶结构由多个亚基组成，其中亚基 α（alpha）和亚基 β（beta）在其 F1 部分扮演核心角色，对 ATP 合成过程至关重要[29]。

亚基 α，作为 ATP 合酶的主要结构组成部分，位于 F1 部分，每个 ATP 合酶复合体通常包含三个 α 亚基。尽管 α 亚基本身不直接参与 ATP 的合成，但它在维持整个酶复合体的结构稳定性和功能正常化中发挥着关键作用。它与 β 亚基交替排列，形成一个环状结构，为 ATP 合成的催化中心提供必要的结构支撑[30]。亚基 β，另一个位于 F1 部分的关键组成部分，也包含三个 β 亚基。与 α 亚基不同，β 亚基直接参与 ATP 的合成，含有活性催化位点。在 ATP 合酶的运作过程中，β 亚基会经历多种构象变化，这些变化对 ATP 的合成和释放至关重要。除 ATP 合酶外还有 Apolipoprotein E 与能量代谢十分相关，其他蛋白的变化也值得探索。

Immunoglobulin superfamily member 8 (IgSF8)与整合素(integrin)相互作用[31]，整合素是细胞外基质受体，由于变构构象变化，它介导细胞外和细胞内环境之间的生化和机械双向信号。在大脑中，它们存在于神经元和神经胶质细胞中，它们在大脑发育和功能的几个方面发挥着重要作用，例如细胞迁移、轴突引导、突触发生、突触可塑性和神经炎症。也有报道整合素和成瘾有关[32]。此外 Immunoglobulin superfamily member 21 与神经素相互作用[33]，而神经素亦与成瘾行为相关[34]。基于这些发现，我们可以推测 IgSF8 在成瘾过程中可能扮演着重要的角色。

Dickkopf-related protein 3 局部抑制 Wnt 调节的过程[35]，而 Wnt 通路在中脑多巴胺能系统发育中起重要作用，多巴胺能神经元影响成瘾等神经疾病[36]，此外 Uniprot 通过相似性分析 Nicastrin 在 Wnt 信号通路和下游过程的调节中发挥作用。

Protein kinase C and casein kinase substrate in neurons protein 3 只有对照组的 0.13 倍，其在内吞作用中发挥作用并调节质膜蛋白的内化[37]。在成年期，PACSIN1 已在大脑中被广泛研究，并被证明可以调节神经形态发生、受体运输和突触可塑性[38]。

我们的研究表明，游戏成瘾和药物成瘾之间可能存在着相同的生物学机制。这一点从成瘾行为相关蛋白质和神经递质通路的共同变化中得到了支持。这种相似性指出，尽管成瘾的对象不同（如游戏或药物），但它们在生物学上可能遵循类似的模式。

3.2 富集通路分析

通过 DAVID Functional Annotation Bioinformatics Microarray Analysis 分析富集到对安非他命上瘾、对皮质酮的反应、钙离子相关以及一氧化氮合酶的相关通路，如表 3、表 4.

通过使用基因本体论（GO）分析方法，我们发现了一个引人注目的现象：我们在通路中发现许多与钙离子相关的通路，包括：细胞钙离子输出负调控、钙离子跨膜转运蛋白活性的负调控、高压门控钙通道活性的调控、Ryanodine 敏感性钙释放通道活性的正调控、钙介导的信号传导调控、钙离子反应、肌浆网对固钙离子向胞浆释放的调控等。

Long-term potentiation (LTP) 是一个关键的神经生物学过程，它导致突触连接的加强，并在学习和记忆形成中发挥至关重要的作用。LTP 的一个关键触发因素是突触后区域内钙离子（Ca2+）浓度的升高。这种 Ca2+浓度增加激活了一系列复杂的细胞内信号传导途径。具体来说，Ca2+的升高触发了环状腺苷酸（cAMP）的生成，这是通过激活腺苷酸环化酶来实现的。接着，cAMP 激活了蛋白激酶 A（PKA），这反过来导致神经末梢在每次动作电位到达时释放的谷氨酸量持续增加。在成瘾的神经适应中，LTP 也扮演着重要角色。研究显示，滥用药物能在大脑的奖励回路中诱导 LTP，尤其是在腹侧被盖区（Ventral Tegmental Area, VTA），这是一个与成瘾发展密切相关的关键区域。值得注意的是，突触前 LTP 主要由突触

前终末内 Ca2+的活性依赖性增加所触发[39, 40]。

在我们研究的差异蛋白中，我们特别注意到了 Cerebellin-4（Cbln4）。Cbln4 在内嗅皮层中的高度表达显得尤为重要，因为它对嗅皮质到齿状回的突触长时增强（LTP）起着至关重要的作用。具体而言，突触前的 Cbln4 与突触后的 neogenin-1 结合，这一过程对于嗅皮质到齿状回突触的 LTP 是必要的[41]。基于这一发现，我们推测 Cerebellin-4 可能在成瘾过程中也扮演了一个关键角色。另外 Leucine-rich repeat neuronal protein 4 在海马依赖性持久记忆中起作用[42]，其可能在成瘾中发挥重要作用。

我们在通路中也富集到了一氧化氮合酶活性的正调控，一氧化氮作为一种重要的神经递质，在中枢神经系统中发挥着关键作用。众多研究指出，一氧化氮可能在药物成瘾（包括对阿片类药物、酒精、兴奋剂和尼古丁的依赖）中起到重要的作用。特别值得注意的是，针对一氧化氮合酶的抑制剂已被发现能有效调节这些成瘾物质引发的戒断症状[43]。

值得注意的是:游戏成瘾在脑组织的蛋白质表达模式上与安非他命成瘾通路存在显著相关性。这一发现揭示了游戏成瘾和药物成瘾可能影响相同的神经生物学途径，这些途径在安非他命等更广泛认知的成瘾物质中已被深入研究。我们的结果为理解电子游戏如何在分子层面影响大脑提供了新的视角，并为进一步研究咖啡因及其他兴奋剂如何影响脑功能和成瘾行为提供了有价值的线索。

这些发现揭示了尿液在反映成瘾状态方面的敏感性，为理解成瘾本质提供了新的视角。文中提及钙离子、一氧化氮合酶、ATP 合酶等的变化，这些变化已经被许多研究证明与成瘾有关。值得注意的是其他未被在成瘾领域研究过的蛋白质和通路，它们可能在成瘾机制中扮演着重要角色，本文提供了可靠线索。

表 4 KEGG 富集通路

	Pathways	P-value
KEGG_PATHWAY	Alcoholism	7.90E-05
	Necroptosis	1.80E-04
	Glycosaminoglycan degradation	3.70E-04
	Lysosome	4.60E-04
	ATP-dependent chromatin remodeling	1.20E-02
	Neutrophil extracellular trap formation	1.50E-02
	Renin secretion	1.50E-02
	Amphetamine addiction	1.50E-02
	Aldosterone synthesis and secretion	3.80E-02
	Glucagon signaling pathway	4.70E-02

表 5 GO 富集通路

Pathways	P-value
establishment of protein localization to mitochondrial membrane	1.10E-04
positive regulation of phosphoprotein phosphatase activity	1.10E-04
negative regulation of peptidyl-threonine phosphorylation	2.30E-04
glycosaminoglycan catabolic process	3.10E-04
negative regulation of endopeptidase activity	3.20E-04
negative regulation of calcium ion export from cell	3.60E-04
positive regulation of cyclic-nucleotide phosphodiesterase activity	3.60E-04
positive regulation of nitric-oxide synthase activity	4.50E-04

	nucleus organization	7.10E-04
	negative regulation of calcium ion transmembrane transporter activity	7.50E-04
	regulation of cardiac muscle cell action potential	7.50E-04
	heterochromatin assembly	9.60E-04
	regulation of high voltage-gated calcium channel activity	1.00E-03
	negative regulation of high voltage-gated calcium channel activity	1.00E-03
	positive regulation of ryanodine-sensitive calcium-release channel activity	1.30E-03
GOTERM_BP_DIRECT	regulation of cell communication by electrical coupling involved in cardiac conduction	1.30E-03
	mitochondrion-ER tethering	1.30E-03
	heparan sulfate proteoglycan catabolic process	1.30E-03
	autophagosome docking	1.30E-03
	activation of adenylate cyclase activity	1.70E-03
	negative regulation of ryanodine-sensitive calcium-release channel activity	1.90E-03
	positive regulation of protein serine/threonine kinase activity	2.00E-03
	amyloid precursor protein metabolic process	2.30E-03
	glycolytic process	2.90E-03
	substantia nigra development	3.10E-03
	detection of calcium ion	3.20E-03
	regulation of synaptic vesicle endocytosis	4.10E-03
	regulation of calcium-mediated signaling	4.10E-03
	response to calcium ion	4.50E-03
	response to corticosterone	5.20E-03
	fibroblast migration	5.80E-03
	regulation of ryanodine-sensitive calcium-release channel activity	7.10E-03
	regulation of release of sequestered calcium ion into cytosol by sarcoplasmic reticulum	7.10E-03
	complement activation, classical pathway	7.30E-03
	regulation of cardiac muscle contraction	8.50E-03
	regulation of cardiac muscle contraction by regulation of the release of sequestered calcium ion	9.20E-03
	nitrogen compound metabolic process	9.20E-03
	positive regulation of protein autophosphorylation	1.00E-02
	plasma membrane repair	1.20E-02
	positive regulation of protein dephosphorylation	1.20E-02
	central nervous system development	1.30E-02
	positive regulation of peptidyl-threonine phosphorylation	1.40E-02
	positive regulation of DNA binding	1.70E-02
	peptidyl-cysteine S-trans-nitrosylation	1.80E-02
	protein localization to plasma membrane	1.80E-02
	defense response to fungus	2.00E-02
	response to amphetamine	2.00E-02

regulation of heart rate	2.10E-02
regulation of endocytosis	2.10E-02
limb development	2.30E-02
dermatan sulfate catabolic process	2.40E-02
actin filament fragmentation	2.40E-02
regulation of cytokinesis	2.70E-02
biotin metabolic process	3.00E-02
regulation of anion transport	3.00E-02
cell motility	3.30E-02
blood vessel development	3.40E-02
positive regulation of blood vessel endothelial cell migration	3.60E-02
antimicrobial humoral immune response mediated by antimicrobial peptide	3.60E-02
cerebellum development	3.70E-02
regulation of synaptic vesicle exocytosis	4.50E-02
negative regulation of apoptotic process	4.70E-02
positive regulation of dendritic cell chemotaxis	4.70E-02
positive regulation of protein kinase activity	4.80E-02
G2/M transition of mitotic cell cycle	4.80E-02
response to unfolded protein	4.80E-02

4. 结论

网络游戏成瘾的青少年在尿液蛋白质组成方面与非游戏玩家存在显著差异。在差异蛋白中，我们识别出了多种之前在药物成瘾研究中报道过的蛋白质。

参考文献

[1] BOZ C, DINC M. Examination of game addiction studies conducted in Turkey: A systematic review study [J]. Front Psychiatry, 2023, 14: 1014621.

[2] YALCIN IRMAK A, ERDOGAN S. [Digital Game Addiction Among Adolescents and Younger Adults: A Current Overview] [J]. Turk Psikiyatri Derg, 2016, 27(2): 0.

[3] GENTILE D A, CHOO H, LIAU A, et al. Pathological video game use among youths: a two-year longitudinal study [J]. Pediatrics, 2011, 127(2): e319-29.

[4] KUHN S, GALLINAT J. Brain structure and functional connectivity associated with pornography consumption: the brain on porn [J]. JAMA Psychiatry, 2014, 71(7): 827-34.

[5] MOHAMMAD S, JAN R A, ALSAEDI S L. Symptoms, Mechanisms, and Treatments of Video Game Addiction [J]. Cureus, 2023, 15(3): e36957.

[6] KUSS D J, GRIFFITHS M D. Internet and gaming addiction: a systematic literature review of neuroimaging studies [J]. Brain Sci, 2012, 2(3): 347-74.

[7] WU J, LI X, ZHAO M, et al. Early Detection of Urinary Proteome Biomarkers for Effective Early Treatment of Pulmonary Fibrosis in a Rat Model [J]. Proteomics Clin Appl, 2017, 11(11-12).

[8] VIRREIRA WINTER S, KARAYEL O, STRAUSS M T, et al. Urinary proteome profiling for stratifying patients with familial Parkinson's disease [J]. EMBO Mol Med, 2021, 13(3): e13257.

[9] WATANABE Y, HIRAO Y, KASUGA K, et al. Urinary Apolipoprotein C3 Is a Potential Biomarker for Alzheimer's Disease [J]. Dement Geriatr Cogn Dis Extra, 2020, 10(3): 94-104.

[10] HUAN Y, WEI J, ZHOU J, et al. Label-Free Liquid Chromatography-Mass Spectrometry Proteomic Analysis of the Urinary Proteome for Measuring the Escitalopram Treatment Response From Major Depressive Disorder [J]. Front Psychiatry, 2021, 12: 700149.

[11] WANG Y, ZHANG J, SONG W, et al. A proteomic analysis of urine biomarkers in autism spectrum disorder [J]. J Proteomics, 2021, 242: 104259.

[12] LEE J H, GARBOCZI D N, THOMAS P J, et al. Mitochondrial ATP synthase. cDNA cloning, amino acid sequence, overexpression, and properties of the rat liver alpha subunit [J]. J Biol Chem, 1990, 265(8): 4664-9.

[13] BIERCZYNSKA-KRZYSIK A, PRADEEP JOHN J P, SILBERRING J, et al. Proteomic analysis of rat cerebral cortex, hippocampus and striatum after exposure to morphine [J]. Int J Mol Med, 2006, 18(4): 775-84.

[14] LUO Y, LIAO C, CHEN L, et al. Heroin Addiction Induces Axonal Transport Dysfunction in the Brain Detected by In Vivo MRI [J]. Neurotox Res, 2022, 40(4): 1070-85.

[15] TANNU N, MASH D C, HEMBY S E. Cytosolic proteomic alterations in the nucleus accumbens of cocaine overdose victims [J]. Mol Psychiatry, 2007, 12(1): 55-73.

[16] UJCIKOVA H, CECHOVA K, JAGR M, et al. Proteomic analysis of protein composition of rat hippocampus exposed to morphine for 10 days; comparison with animals after 20 days of morphine withdrawal [J]. PLoS One, 2020, 15(4): e0231721.

[17] LI W, ZHANG C, WANG Y Y, et al. Alterations of RNAs in the insula related to cocaine-induced condition place preference in adolescent mice [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2022, 621: 109-15.

[18] SPAGNOLLI W, TORBOLI P, MATTAREI M, et al. Calcitonin and prolactin serum levels in heroin addicts: study on a methadone treated group [J]. Drug Alcohol Depend, 1987, 20(2): 143-8.

[19] MICHELHAUGH S K, GNEGY M E. Differential regulation of calmodulin content and calmodulin messenger RNA levels by acute and repeated, intermittent amphetamine in dopaminergic terminal and midbrain areas [J]. Neuroscience, 2000, 98(2): 275-85.

[20] PENG S, SU H, CHEN T, et al. The Potential Regulatory Network of Glutamate Metabolic Pathway Disturbance in Chinese Han Withdrawal Methamphetamine Abusers [J]. Front Genet, 2021, 12: 653443.

[21] GARCIA-CARMONA J A, GEORGIOU P, ZANOS P, et al. Methamphetamine withdrawal induces activation of CRF neurons in the brain stress system in parallel with an increased activity of cardiac sympathetic pathways [J]. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 2018, 391(4): 423-34.

[22] BELL C R, HOROWITZ E D, OSHRINE B R, et al. Profound inhibition of GPIb, GPIIb/IIIa,

PECAM-1, CD63, and CD107 in a chronic drug addict: selecting controls for platelet flow cytometry in the inner city hospital [J]. Thromb Res, 2001, 101(3): 217-8.
[23] HORIE M, MITSUMOTO Y, KYUSHIKI H, et al. Identification and characterization of TMEFF2, a novel survival factor for hippocampal and mesencephalic neurons [J]. Genomics, 2000, 67(2): 146-52.
[24] ARANO T, FUJISAKI S, IKEMOTO M J. Identification of tomoregulin-1 as a novel addicsin-associated factor [J]. Neurochem Int, 2014, 71: 22-35.
[25] SIEGEL D A, DAVIES P, DOBRENIS K, et al. Tomoregulin-2 is found extensively in plaques in Alzheimer's disease brain [J]. J Neurochem, 2006, 98(1): 34-44.
[26] LIU A, NISWANDER L A. Bone morphogenetic protein signalling and vertebrate nervous system development [J]. Nat Rev Neurosci, 2005, 6(12): 945-54.
[27] JENSEN G S, LEON-PALMER N E, TOWNSEND K L. Bone morphogenetic proteins (BMPs) in the central regulation of energy balance and adult neural plasticity [J]. Metabolism, 2021, 123: 154837.
[28] MANZARI-TAVAKOLI A, BABAJANI A, FARJOO M H, et al. The Cross-Talks Among Bone Morphogenetic Protein (BMP) Signaling and Other Prominent Pathways Involved in Neural Differentiation [J]. Front Mol Neurosci, 2022, 15: 827275.
[29] WALKER J E. The ATP synthase: the understood, the uncertain and the unknown [J]. Biochem Soc Trans, 2013, 41(1): 1-16.
[30] JUNGE W, NELSON N. ATP synthase [J]. Annu Rev Biochem, 2015, 84: 631-57.
[31] STIPP C S, KOLESNIKOVA T V, HEMLER M E. EWI-2 regulates alpha3beta1 integrin-dependent cell functions on laminin-5 [J]. J Cell Biol, 2003, 163(5): 1167-77.
[32] JAUDON F, THALHAMMER A, CINGOLANI L A. Integrin adhesion in brain assembly: From molecular structure to neuropsychiatric disorders [J]. Eur J Neurosci, 2021, 53(12): 3831-50.
[33] TANABE Y, NAITO Y, VASUTA C, et al. IgSF21 promotes differentiation of inhibitory synapses via binding to neurexin2alpha [J]. Nat Commun, 2017, 8(1): 408.
[34] KASEM E, KURIHARA T, TABUCHI K. Neurexins and neuropsychiatric disorders [J]. Neurosci Res, 2018, 127: 53-60.
[35] YU C, SEATON M, LETENDRE S, et al. Plasma dickkopf-related protein 1, an antagonist of the Wnt pathway, is associated with HIV-associated neurocognitive impairment [J]. AIDS, 2017, 31(10): 1379-85.
[36] ALVES DOS SANTOS M T, SMIDT M P. En1 and Wnt signaling in midbrain dopaminergic neuronal development [J]. Neural Dev, 2011, 6: 23.
[37] MODREGGER J, RITTER B, WITTER B, et al. All three PACSIN isoforms bind to endocytic proteins and inhibit endocytosis [J]. J Cell Sci, 2000, 113 Pt 24: 4511-21.
[38] DUMONT V, LEHTONEN S. PACSIN proteins in vivo: Roles in development and physiology [J]. Acta Physiol (Oxf), 2022, 234(3): e13783.
[39] MALENKA R C, BEAR M F. LTP and LTD: an embarrassment of riches [J]. Neuron, 2004, 44(1): 5-21.
[40] NICOLL R A, SCHMITZ D. Synaptic plasticity at hippocampal mossy fibre synapses [J]. Nat Rev Neurosci, 2005, 6(11): 863-76.
[41] LIAKATH-ALI K, POLEPALLI J S, LEE S J, et al. Transsynaptic cerebellin 4-neogenin 1 signaling mediates LTP in the mouse dentate gyrus [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2022, 119(20): e2123421119.

[42] BANDO T, SEKINE K, KOBAYASHI S, et al. Neuronal leucine-rich repeat protein 4 functions in hippocampus-dependent long-lasting memory [J]. Mol Cell Biol, 2005, 25(10): 4166-75.

[43] TAYFUN UZBAY I, OGLESBY M W. Nitric oxide and substance dependence [J]. Neurosci Biobehav Rev, 2001, 25(1): 43-52.